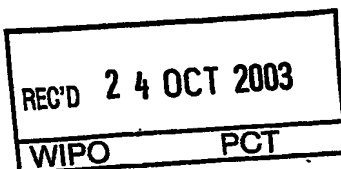


10/522124
Rec'd PCT/PTO 24 JAN 2005
PCT/FR 03 / 0 2 3 0 9 #2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 25 JUL. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 017 / 010801

REMISE DES PIÈCES DATE 24 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0209377 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 24 JUIL. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv644/68FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) EXPRESSION DE RECEPTEURS A 7 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES EN SYSTEME BACULOVIRUS/CELLULES D'INSECTES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège		Rue 3, rue Michel-Ange	
		Code postal et ville 75016 PARIS	
		Pays FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 24 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0209377 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		MJPbv644/68FR
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		 CABINET ORES
Adresse	Rue	6, avenue de Messine
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques. <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes		1
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 24 juillet 2002 ORES, Béatrice (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI C. MARTIN



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

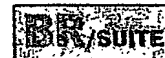
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



Réservé à l'INPI

REMISS DES PIÈCES

DATE

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

24

JUIL 2002

75

INPI PARIS

0209377

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 3 W / 180601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/68FR
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement public
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	147, rue de l'Université
	Code postal et ville	75 007 PARIS
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement public
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	Place Eugène Bataillon
	Code postal et ville	34 095 MONTPELLIER Cedex 5
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
Paris, le 24 juillet 2002 ORES Béatrice (n° 92-4046)		C. MARTIN

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

L'invention est relative à la production, dans un système baculovirus/cellules d'insecte, de récepteurs à sept domaines transmembranaires, et notamment de récepteurs couplés aux protéines G.

5 La super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs), comprend notamment de nombreux récepteurs membranaires de neurotransmetteurs, de neuropeptides et d'hormones. Ils ont tous la même organisation structurale, à savoir une seule
10 chaîne polypeptidique comprenant sept domaines hydrophobes qui traversent la double couche lipidique membranaire.

Parmi les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs olfactifs (ORs) représentent une très large famille et constituent chez les vertébrés la famille
15 numériquement la plus importante (ZOZULYA et al., Genome Biology, 6(2), 2001 : <http://www.genomebiology.com/2001/2/6/research/0018.1> ; ZHANG et FIRESTEIN, Nat. Neurosci., 5(2), 124-133, 2002). Ils sont principalement localisés à la surface des membranes des cellules neuroréceptrices (neurones
20 olfactifs) de l'épithélium olfactif, mais leur expression dans d'autres tissus a également été rapportée. Un très grand nombre de gènes codant pour des récepteurs olfactifs ont été identifiés, permettant d'évaluer à plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, le nombre de types différents de
25 récepteurs olfactifs chez un mammifère. Depuis l'isolement initial d'ADNc codant pour des ORs à partir de l'épithélium olfactif de rat (BUCK et AXEL, Cell, 65 (1), 175-187, 1991), des gènes codant pour des ORs putatifs ont été clonés à partir de nombreuses espèces de vertébrés, dont l'homme, et
30 d'invertébrés, (pour revue, voir Mombaerts, Annual Review of Neuroscience, 22, 487-509, 1999). Les séquences totales ou partielles de ces gènes sont accessibles sur les bases de données, et sont notamment regroupées dans la base ORDB accessible à l'adresse <http://ycmi.med.yale.edu/senselab/ordb/>
35 (SKOUFOS et al., Nucl. Acids Res., 28, 341-343, 2000).

Les critères, établis d'après les données de séquences disponibles, qui sont habituellement utilisés pour

classer un récepteur à sept domaines transmembranaires parmi les récepteurs olfactifs sont les suivants :

- la taille de la molécule : il s'agit de récepteurs de petite taille (environ 300-400 acides aminés), dans lesquels les boucles intra- et extracellulaires et le segment terminal sont très courts (environ 15 à 40 acides aminés pour les boucles intra- et extracellulaire, et environ 20 à 30 acides aminés pour le segments N-terminal) ;
- l'homologie des séquences en acides aminés : certains motifs d'acides aminés sont très conservés entre les différents récepteurs olfactifs (BUCK et AXEL, Cell, 65 (1), 175-187, 1991 ; PILPEL et LANCET, Protein Science, 8 (5), 969-977, 1999). Il s'agit notamment des motifs : PMYLFLGNLS (SEQ ID NO : 10) au début du domaine transmembranaire II, MAYDRYVAIC (SEQ ID NO : 11) à la fin du domaine transmembranaire IV et au début de la boucle intracellulaire i2, SY à la fin du domaine transmembranaire V, FSCSSH (SEQ ID NO : 12) au début du domaine transmembranaire VI et PMLNPF (SEQ ID NO : 13) dans le domaine transmembranaire VII. Généralement, la coexistence de ces motifs est suffisante pour classer une séquence de vertébré à sept domaines transmembranaires dans la famille des ORs. D'une manière plus générale, la plus grande conservation entre les différents récepteurs olfactifs se situe au niveau des domaines transmembranaires II, VI, VII et de la boucle intracellulaire i2. Au contraire, les domaines transmembranaires III, IV et V sont des régions hypervariables.

La liaison d'une molécule odorante à un récepteur olfactif entraîne l'activation de protéines G qui stimulent la cascade enzymatique conduisant à la production d'AMP cyclique (AMPC). L'AMPC induit à son tour l'ouverture de canaux ioniques sodiques et calciques, entraînant la dépolarisation de la membrane du neurone olfactif, et induisant ainsi un influx nerveux qui transmet le signal au bulbe olfactif.

Un second mécanisme de transduction olfactif a également été proposé, faisant intervenir comme second messager l'inositol triphosphate (IP₃) au lieu de l'AMPC

(BOEKHOFF et al., EMBO Journal, 9 (8), 2453-2458, 1990 ; SCHILD et al., Journal of Neurophysiology, 73 (2), 862-866, 1995). Des expérimentations récentes indiquent toutefois que, physiologiquement, la transduction olfactive serait
 5 principalement générée par la voie de l'AMPC et non par celle d'IP₃ (BELLUSCIO et al., Neuron., 20 (1), 69-81, 1998 ; WONG et al., Neuron., 27 (3), 487-497, 2000 ; BRUNET et al., Neuron., 17 (4), 681-693, 1996).

Les protéines G qui ont été identifiées comme
 10 impliquées dans la transduction du signal olfactif par la voie de l'AMPC sont G_{as} et G_{olf}. Dans le cas de la transduction par la voie IP₃, il a été rapporté que les protéines G_o ou G_q (FADOOL et al., Chemical Senses, 20, 489-498, 1995 ; SCHANDAR et al., J. Biol. Chem., 273, 16669-
 15 16677, 1998) pourraient être impliquées.

L'expression en système hétérologue constitue potentiellement un outil majeur pour la caractérisation fonctionnelle et la bioingénierie des récepteurs couplés aux protéines G.

Des récepteurs couplés aux protéines G ont été
 20 exprimés sous forme fonctionnelle dans différents systèmes hétérologues : on citera notamment le système baculovirus/cellules d'insectes, qui a été utilisé par exemple pour exprimer des récepteurs adrénergiques, des
 25 récepteurs muscariniques, des récepteurs à la sérotonine, aux canabinoïdes, à l'ocytocine, à la substance P, etc. (PARKER et al., J. Biol. Chem., 266 (1), 519-527, 1991 ; RICHARDSON et HOSEY, J. Biol. Chem., 267 (31), 11149-22255, 1992 ; VASUDEVAN et al., FEBS Lett., 311 (1), 7-11, 1992 ; BUTKERAIT
 30 et al., J. Biol. Chem., 270 (31), 18691-18699, 1995 ; NOWELL et al., Biochemical Pharmacology, 55 (11), 1893-1905, 1998 ; GIMPL et al., Biochemistry, 34 (42), 13794-13801, 1995 ; NISHIMURA et al., Journal of Receptor & Signal Transduction Research, 18 (1), 51-65, 1998), ainsi que pour reconstituer
 35 le couplage RCPG/protéine G, par coexpression sous contrôle du promoteur de la polyédrique, d'un récepteur et d'une protéine G (BUTKERAIT et al., J. Biol. Chem., 270 (31),

18691-18699, 1995 ; BARR et al., J. Biol. Chem., 272 (4), 2223-2229-1997).

L'expression en système hétérologue est d'un intérêt tout particulier dans le cas des récepteurs olfactifs, qui sont en majorité des récepteurs orphelins, dont les ligands ne sont pas connus.

Quelques récepteurs olfactifs ont ainsi été exprimés dans des cellules de mammifères ou d'insectes. Dans le cas des cellules d'insecte, RAMING et al. (Nature, 361 (3410), 353-356, 1993) ont exprimé le récepteur OR5 de rat dans des cellules Sf9 après infection par un baculovirus recombinant, et ont observé des augmentations transitoires du second messenger IP_3 dans les cellules infectées en réponse à une stimulation par le lyral ou le lilial. Des résultats similaires ont été rapportés par BREER et al. (Annals of the New York Academy of Sciences, 855, 175-181, 1998).

Cependant, une limitation au développement à l'utilisation de systèmes d'expression hétérologues, en particulier dans le cas des récepteurs olfactifs, résulte d'un niveau d'expression relativement faible de récepteurs fonctionnels à la surface cellulaire. Il est supposé que ce problème résulte d'un mauvais adressage à la membrane plasmique quand ces récepteurs sont exprimés dans des cellules autres que les neurones olfactifs matures. Il semble que des interactions intra-moléculaires au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire pourraient être à l'origine de la rétention de ces protéines dans les compartiments intracellulaires (GIMELBRANT et al., Journal of Neurochemistry, 72 (6), 2301-2311, 1999).

Pour améliorer l'adressage à la membrane des récepteurs olfactifs dans des cellules de mammifères, il a été proposé de les fusionner avec un peptide signal hétérologue. Des banques d'ORs chimériques, fusionnés avec le peptide signal d'un récepteur de la rhodopsine ou de la sérotonine, ont été exprimés dans des cellules HEK293 (KRAUTWURST et al., Cell, 95 (7), 917-926, 1998 ; WETZEL et al., Journal of Neuroscience, 19 (17), 7426-7433, 1999). Il a ainsi été observé que l'exposition de ces cellules

transfectées à des mélanges odorants conduisait à des augmentations transitoires du calcium intracellulaire, et que cette réponse était amplifiée quand les ORs étaient co-exprimés avec la protéine $G_{\alpha 15-16}$ (également dénommée $G_{\alpha 16}$), un sous-type de G_q universel (KRAUTWURST et al., précité).

Il a également été proposé d'exprimer des récepteurs olfactifs dans des neurones olfactifs matures, afin de permettre d'une part leur adressage et leur insertion correcte dans la membrane plasmique, et d'autre part de fournir un système de seconds messagers adaptés, capables de générer un signal suffisamment important pour être détecté (Brevet US 5 993 778).

Les Inventeurs ont maintenant mis au point un système améliorant l'expression de récepteurs couplés aux protéines G, et notamment de récepteurs olfactifs, dans des cellules d'insectes.

Ils ont émis l'hypothèse que l'adressage à la membrane de ces récepteurs pouvait être plus efficace si on les exprimait sous contrôle d'un promoteur plus faible que le promoteur polyédrine habituellement utilisé pour l'expression de gènes hétérologues dans un baculovirus.

Ils ont testé différents promoteurs, et ont constaté que l'utilisation d'un promoteur de la polyédrine partiellement tronqué afin de diminuer son activité, permettait d'améliorer l'adressage des récepteurs à la membrane plasmique des cellules hôte d'insecte, et d'obtenir ainsi l'expression en surface de récepteurs fonctionnels.

La présente invention a pour objet une cassette d'expression comprenant :

- a) un promoteur dérivé du promoteur de la polyédrine d'un baculovirus par délétion de tout ou partie de la région dudit promoteur s'étendant des positions -1 à -12 par rapport au site d'initiation de la traduction de la polyédrine ;
- b) une séquence codant pour un récepteur à sept domaines transmembranaires, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

Avantageusement, pour obtenir le niveau d'expression optimal dans le cadre de la mise en œuvre de la présente invention, on utilise un promoteur dans lequel la portion délétée comprend au moins la région s'étendant des positions -1 à -5 par rapport au site d'initiation de la traduction de la polyédrine.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite cassette d'expression comprend en outre, en amont de la séquence b), une séquence c) codant pour un peptide signal.

A titre d'exemples non limitatifs de séquences codant pour des peptides signal utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention, on citera le peptide signal de l'Ecdystéroïde UDP Glucosyl Transférase (EGT) du baculovirus AcNPV, le peptide signal de la lactotransferrine bovine, etc.

Ladite cassette d'expression peut également comprendre en amont ou en aval de la séquence b) codant pour le récepteur à sept domaines transmembranaires, une séquence d) codant pour un peptide étiquette facilitant la détection du récepteur recombinant exprimé. A titre d'exemples non limitatifs de peptides étiquette utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention, on citera l'épitope FLAG, l'épitope HA, etc.

Une cassette d'expression conforme à l'invention peut être construite pour exprimer n'importe quel récepteur à sept domaines transmembranaires. De manière particulièrement avantageuse, ledit récepteur est un récepteur olfactif.

La présente invention a également pour objet un procédé pour exprimer un récepteur à sept domaines transmembranaires dans une cellule d'insecte, caractérisé en ce que l'on infecte ladite cellule d'insecte avec un baculovirus recombinant comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus. Avantageusement, ladite cassette d'expression est insérée en remplacement du promoteur et du gène natifs de la polyédrine dudit baculovirus.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, on exprime également dans la même cellule

d'insecte, une protéine G qui peut être marquée à son extrémité N-terminale par un peptide étiquette, par exemple l'épitope HA, sans que cela gêne l'expression de la protéine à la surface de la cellule d'insecte ou son couplage au
5 récepteur.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ladite protéine G est exprimée sous contrôle du promoteur du gène P10 d'un baculovirus.

10 Les Inventeurs ont en effet constaté que l'utilisation du promoteur du gène P10, dont l'expression est un peu plus précoce que celle du gène de la polyédrine, permet d'exprimer un récepteur à sept domaines transmembranaires dans une cellule contenant déjà une
15 quantité importante de protéine G, et ainsi d'optimiser le couplage entre ledit récepteur et ladite protéine.

La co-expression du récepteur à sept domaines transmembranaires et de ladite protéine G peut être effectuée en co-infectant une cellule d'insecte par deux baculovirus
20 recombinants : l'un exprimant le récepteur dans une cassette d'expression conforme à l'invention, et l'autre exprimant ladite protéine G sous contrôle du promoteur de la protéine P10.

Toutefois, de manière particulièrement
25 avantageuse, on utilisera un baculovirus double-recombinant, comprenant :

- une cassette d'expression conforme à l'invention, et
- une séquence codant pour une protéine G placée
30 sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène P10 qui peut également comprendre en amont, une séquence codant pour un peptide étiquette, par exemple l'épitope HA.

La présente Invention a également pour objet des vecteurs recombinants, portant au moins une cassette
35 d'expression conforme à l'invention telle que définie ci-dessus.

Dans ce cadre, la présente Invention englobe en particulier :

- des plasmides de transfert, portant un insert comprenant : une cassette d'expression conforme à l'invention, telle que définie ci-dessus, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine chez le baculovirus dans lequel on souhaite insérer la cassette ;

- des baculovirus recombinants contenant une cassette d'expression conforme à l'invention ; de manière préférée, il s'agit de baculovirus double-recombinants, comprenant en outre une séquence codant pour une protéine G, sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène P10. Ces baculovirus peuvent notamment être obtenus, de manière classique, par recombinaison homologue entre un plasmide de transfert conforme à l'invention et le génome d'un baculovirus. Dans le cas des baculovirus double-recombinants, on effectue une étape supplémentaire de recombinaison homologue entre un plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour une protéine G, flanquée de séquences de baculovirus homologues de celles flanquant la séquence codant pour la protéine P10 chez le baculovirus concerné.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, on peut utiliser les outils classiques de clonage et d'expression de gènes d'intérêt dans un système baculovirus/cellules d'insecte, tels que ceux décrits par exemple dans BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS : A LABORATORY MANUAL [O'REILLY et al., Freeman and Cie, New York, (1994)], ainsi que dans un grand nombre de Brevets ou Demandes de Brevets, tels que, par exemple, la Demande EP 0 651 815, la Demande EP 0 638 647 ou la Demande PCT WO 95/20672.

La présente invention a également pour objet des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant conforme à l'invention ; ces cellules expriment à leur surface des récepteurs à sept domaines transmembranaires fonctionnels, capables de se coupler soit à des protéines G endogènes de baculovirus, dans le cas où ils sont exprimés seuls, soit aux protéines G exogènes co-exprimées dans la même cellule.

Les cellules d'insectes selon la présente invention peuvent être utilisées pour l'étude et la caractérisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires, notamment pour vérifier la fonctionnalité
 5 de récepteurs putatifs, identifier les ligands de récepteurs orphelins, ou étudier des mécanismes impliqués dans l'activation du récepteur, la transduction du signal, par exemple l'identification de la ou des protéine(s) G partenaire(s) du récepteur concerné, l'étude du couplage à
 10 ces protéines, et de la fonction du complexe ainsi formé, etc..

Le signal résultant de la liaison de ces récepteurs avec leur(s) ligand (s) peut être détecté par différentes techniques qui sont connues en elles-mêmes. Par
 15 exemple, on peut détecter des variations du calcium intracellulaire, notamment par imagerie calcique, ou des variations des seconds messagers, inositol phosphate ou AMP cyclique ; on peut également détecter la phosphorylation et/ou l'activité kinase des protéines impliquées dans la
 20 cascade de transduction, etc..

La présente invention a ainsi notamment pour objet :

* Un procédé pour identifier un récepteur à sept domaines transmembranaires fonctionnel, et/ou identifier la
 25 protéine G partenaire d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une cellule d'insecte conforme à l'invention exprimant un récepteur ou une
 30 combinaison récepteur/protéine G à tester avec un mélange de ligands potentiels dudit récepteur ;

- la détection du signal résultant de la liaison dudit récepteur avec l'un des ligands présents dans ledit mélange.

35 * Un procédé pour identifier un ligand d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de chaque ligand à tester avec une cellule d'insecte conforme à l'invention, exprimant un récepteur à sept domaines transmembranaires fonctionnel, et une protéine G partenaire dudit récepteur ;

5 - l'identification du ou des ligands recherchés, par détection du signal résultant de leur liaison avec ledit récepteur.

* Un procédé pour identifier un récepteur à sept domaines transmembranaires répondant à un ligand d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact dudit ligand avec une cellule d'insecte conforme à l'invention exprimant un récepteur à sept domaines transmembranaires à tester et une protéine G partenaire dudit récepteur ;

15 - l'identification du ou des récepteurs recherchés, par détection du signal résultant de leur liaison avec ledit ligand d'intérêt.

Dans ce cadre, on peut notamment utiliser des cellules d'insecte conformes à l'invention pour exprimer des récepteurs à sept domaines transmembranaires mutants, et cribler le ou les mutants reconnaissant un ligand d'intérêt.

De manière particulièrement avantageuse, les cellules d'insectes selon la présente invention sont utilisées comme décrit ci-dessus, pour l'étude et la caractérisation de récepteurs olfactifs.

Les ligands des récepteurs olfactifs peuvent être des molécules odorantes, des protéines de transport des odorants (OBP pour : « olfactory binding proteins »), des complexes molécule odorante/OBP, ou des molécules synthétiques telles que les cyclodextrines utilisées en parfumerie (savons, bougies, papiers, etc) comme fixateurs d'odorants relâchant très progressivement l'odorant volatile.

Ainsi, on peut utiliser des cellules d'insecte conformes à l'invention pour étudier la fonctionnalité de récepteurs olfactifs putatifs, et/ou de différentes combinaisons récepteur/protéine G, notamment en testant leur réponse à des mélanges de molécules odorantes, des mélanges d'OBPs, des mélanges de complexes molécule odorante/OBP, ou

des mélanges de molécules synthétiques telles que définies ci-dessus.

Lorsqu'un récepteur fonctionnel a été identifié, on peut utiliser des cellules d'insecte conformes à l'invention exprimant ledit récepteur et une protéine G partenaire dudit récepteur pour identifier le ou les ligands du récepteur concerné, en testant séparément la réponse de ce récepteur à différentes molécules odorantes ou complexes molécule odorante/OBP. On peut également utiliser des cellules d'insectes conformes à l'invention exprimant des récepteurs olfactifs fonctionnels et des protéines G partenaires desdits récepteurs pour identifier ceux qui répondent à un ligand d'intérêt, en testant séparément la réponse de chacun de ces récepteurs à différentes molécules odorantes ou complexes molécule odorante/OBP.

Des cellules d'insecte conformes à l'invention exprimant un récepteur olfactif fonctionnel dont le ligand a été identifié peuvent avantageusement être utilisées pour l'obtention de biocapteurs, permettant la détection de molécules odorantes, notamment pour l'analyse et le contrôle qualité de composants volatils, au nombre desquels figurent des produits aromatiques d'intérêt, et/ou pour la détection de produits risquant d'affecter les qualités organoleptiques, ou pour la détection de produits potentiellement nocifs.

Par exemple, la présente invention peut être mise en œuvre pour :

- exprimer et purifier des récepteurs olfactifs orphelins chez différentes espèces (par exemple homme, animaux domestiques, etc.);
- produire des anticorps spécifiques de ces récepteurs utilisables dans le typage immunocytochimique de neuroépithélium prélevé en clinique, par exemple dans le cas d'une greffe de cellules engainantes dans la moelle épinière lésée;
- cribler des molécules odorantes ou des OBPs (naturelles ou recombinantes) pour une utilisation pharmacologique;

- cribler des récepteurs olfactifs mutants fonctionnels ou des OBPs mutées à l'aide de molécules odorantes d'intérêt, par exemple des arômes alimentaires, des fumets, des parfums, etc.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'expression, conformément à l'invention, de récepteurs olfactifs fonctionnels dans des cellules d'insecte.

EXEMPLE 1 : OBTENTION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT DES RECEPTEURS OLFACTIFS HUMAINS SOUS CONTROLE D'UN PROMOTEUR DE LA POLYEDRINE MODIFIE.

Construction des vecteurs de transfert.

Vecteur pGmAc 217 :

Ce vecteur contient un insert, obtenu à partir du fragment EcoRI I de 7 kb environ du baculovirus AcMNPV, comprenant la région de la polyédrine, par délétion du fragment -8 +502 (par rapport au site d'initiation de la traduction de la polyédrine) et remplacement de la portion déléetée par un lieur BglII. L'insert ainsi obtenu comprend donc un promoteur *polh* de la polyédrine déléeté de 8 pb (positions -1 à -8).

Insertion d'un peptide signal et d'une séquence de marquage :

Un oligonucléotide est inséré dans le vecteur pGmAc 217, immédiatement en aval du promoteur *polh* modifié. La séquence de cet oligonucléotide est la suivante :

5'-ATG ACT ATT CTC TGC TGG CTT GCA CTG CTG TCT ACG CTT ACT
GCT GTT AAC GCG GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAA GCC ATG GCT
 GCT CGG TAC CCT GCA CGA GCT C-3'

(SEQ ID NO : 1)

Cet oligonucléotide comprend une séquence de 54 pb (soulignée) codant pour le peptide signal de l'Ecdystéroïde UDP Glucosyl Transférase (EGT) du baculovirus AcNPV (GenBank M22619), suivie par la séquence codant pour l'épitope FLAG (en italiques), elle-même suivie de deux sites de restriction uniques NcoI et KpnI (en gras).

Gènes codant pour les récepteurs olfactifs

Les gènes sans introns codant pour les récepteurs olfactifs putatifs OR-209 et OR-210 à partir du chromosome humain 17 (p13.3) sont amplifiés par PCR en utilisant le
5 cosmide No. ICRF105cF06137 (GenBank N°HSU53583).

Les amorces oligonucléotidiques sens (S) et antisens (AS) suivantes sont utilisées :

OR-209 NcoI S :

5'-TAA GAA GCT TGC CAC CAT GGA GGG GAA AAA TCT G-3'

10 (SEQ ID NO: 2) ;

OR-209 KpnI AS :

5'-TAA CGG TAC CGC GGC CGC CTA AGG GGA ATG AAT TTT CCG-3'

(SEQ ID NO: 3) ;

OR-210 NcoI S :

15 5'-CAA TAA GCT TCC ATG GCT ATG TAT TTG TGT CTC AGC AAC-3'

(SEQ ID NO : 4) ;

OR-210 KpnI AS :

5'-TAA CGG TAC CGC GGC CGC TTA AGC CAC TGA TTT AGA GTG-3'

(SEQ ID NO: 5).

20 Les amplifications sont effectuées dans le mélange réactionnel suivant :

10 ng de la préparation d'ADN du cosmide, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,001% de gélatine, 0,2 mM de dNTP, 1,5 U de mélange de polymérases
25 EXPAND™ (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS) et 100 pmol de chacune des amorces ;

et selon le programme suivant : 94°C (90 sec, 1 cycle), 94°C (20 sec), 50°C (25 sec) et 72°C (90 sec) (40 cycles) ; 72°C (120 sec, 1 cycle).

30 Les deux produits de PCR sont digérés avec NcoI/KpnI et les fragments résultant sont sous-clonés entre les sites NcoI et KpnI du vecteur pGmAc 217 contenant le peptide signal.

Les vecteurs de transfert obtenus, dénommés pGmAc
35 217-209 et pGmAc 217-210 contiennent respectivement la séquence codant pour le récepteur OR-209 et la séquence codant pour le récepteur OR-210.

Construction des baculovirus recombinants

Les virus recombinants sont obtenus par co-transfection de cellules Sf9 avec l'ADN du baculovirus sauvage AcMNPV, et l'ADN du vecteur de transfert pGmAc 217-209 ou pGmAc 217-210.

Les cellules Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (ATCCCL 1711) sont cultivées en flacon plastique de 25 ou 75 cm² et maintenues à 28°C dans un milieu TC100 (GIBCO-BRL) contenant 5% de sérum bovin fœtal (GIBCO-BRL). Des sous-cultures sont effectuées deux fois par semaine.

L'ADN de baculovirus de type sauvage AcMNPV est préparé à partir de particules virales.










La co-transfection est effectuée par lipofection, en incubant 2×10^6 cellules avec 3 ml de milieu sans sérum contenant 500 ng d'ADN de baculovirus et 10 µg de vecteur de transfert, mélangés avec 40 µl de DOTAP (ROCHE, France). Après 4 heures d'incubation à 28°C, le mélange de transfection est éliminé et remplacé par 5 ml de milieu supplémenté de sérum. Les baculovirus recombinants sont récupérés à partir du surnageant des cellules transfectées après 5 jours d'incubation à 28°C.

Les baculovirus recombinants sont isolés par trois étapes de purification par plage de lyse et sélectionnés sur la base d'un phénotype ob- (absence de corps d'inclusion), puis multipliés par des infections cellulaires successives. Les baculovirus recombinants dénommés ci-après AcMNPV209 et AcMNPV210 contiennent respectivement la séquence codant pour le récepteur OR-209 et la séquence codant pour le récepteur OR-210.

Les baculovirus recombinants sont stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

La Figure 1 A représente un schéma général des différentes étapes de construction d'un baculovirus recombinant comprenant une séquence codant pour un récepteur OR, associé au peptide signal du gène EGT et à la séquence de marquage de l'épitope FLAG. Les baculovirus AcMNPV209 et AcMNPv210 sont représentés sur la Figure 1 C.

Légende de la Figure 1 :

-  Polyédrine
-  Promoteur polyédrine
-  P10
- 5  Promoteur P10
-  Récepteur olfactif
-  Peptide signal EGT
-  Epitope FLAG
-  Epitope HA
- 10  Protéine G

EXEMPLE 2 : OBTENTION D'UN BACULOVIRUS DOUBLE-RECOMBINANT EXPRIMANT UN RECEPTEUR OLFACTIF HUMAIN SOUS CONTROLE D'UN PROMOTEUR DE LA POLYEDRINE MODIFIE, ET UNE PROTEINE G SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR P10.

15 Construction des vecteurs de transfert.

Vecteur hôte :

On utilise le vecteur p119 (LEMEULLE et al., FEBS Lett., 423, 159-166, 1998) contenant les sites de clonage unique BglIII et HindIII localisés en aval du promoteur p10 du baculovirus.

Gènes codant pour des protéines G

Protéine G_{α16}

L'ADNc codant pour la protéine G_{α16} a été obtenu à partir d'une banque d'ADNc de la lignée promyélocytique de la leucémie humaine HL60 (CLONTECH, France). La séquence de marquage par l'épitope HA est introduite par PCR.

Les oligonucléotides sens (S) et anti-sens (AS) qui ont été utilisés sont les suivants :

G_{α16} BglIII HA S :

30 5'-TTA CGA TAT CAG ATC TGC CAC CAT GTA CCC CTA CGA CGT CCC
TGA CTA CGC CAT GGC CCG CTC GCT GAC C-3'

(SEQ ID NO: 6) ;

G_{α16} HindIII AS :

5'-CTA TAA GCT TTC ACA GCA GGT TGA TCT CGT CCA G-3'

35 (SEQ ID NO: 7).

L'amplification est effectuée dans le mélange réactionnel suivant :

10 ng de préparation d'ADNc, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,001% de gélatine, 5 0,2 mM de dNTP, 1,5 U de mélange de polymérases EXPAND™ (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS) et 100 pmol de chacune des amorces ;

et selon le programme suivant : 94°C (60 sec, 1 cycle), 94°C (45 sec), 58°C (45 sec) et 72°C (90 sec) 10 (35 cycles) ; 72°C (120 sec, 1 cycle).

Protéine G_{αolf}

L'ADNc codant pour la protéine G_{αolf} a été cloné par RT-PCR à partir d'une préparation d'ARN total de cerveau entier fournie par le Dr. Gilles TOUMANIANTZ (IPMC, Nice, 15 France). Les ARNm sont obtenus en incubant (5 mn à 70°C et 5 mn à 4°C) 4 µg d'ARN total avec 1 µg d'amorce oligonucléotidique dT (INVITROGEN) dans un volume final de 15 µl. 10 µl de la préparation d'ARNm sont alors utilisés comme échantillon pour la transcription inverse en ADNc en 20 utilisant le kit « cDNA cycle » d'INVITROGEN (Pays Bas). La rétro-transcription est réalisée à 42°C pendant 70 mn et la réaction est inactivée à 94°C pendant 5 mn. L'ADNc synthétisé est utilisé comme matrice pour les amplifications PCR ultérieures.

25 La séquence de marquage par l'épitope HA est introduite par PCR.

Les oligonucléotides sens (S) et anti-sens (AS) utilisés pour cette PCR sont les suivants :

G_{αolf} BglIII HA S :

30 5'-TTA CGA TAT CAG ATC TGC CAC CAT GTA CCC CTA CGA CGT CCC
TGA CTA CGC CAT GGG GTG TTT GGG CAA C-3'
(SEQ ID NO : 8) ;

G_{αolf} HindIII AS :

5'-CTA TAA GCT TTC ACA AGA GTT CGT ACT GCT TGA G-3'
35 (SEQ ID NO : 9).

Les conditions d'amplification PCR sont identiques à celles utilisées pour G_{α16}.

Les deux produits de PCR sont digérés avec BglIII/HindIII et les fragments résultant sont sous-clonés entre les sites BglIII et HindIII du vecteur p119.

Les vecteurs de transfert obtenus, dénommés p119-HA-G_{α16} et p119-HA-G_{α1f} pGmAc 217-209 contiennent respectivement la séquence codant pour HA-G_{α16}, et la séquence codant pour HA-G_{α1f}.

Construction des baculovirus recombinants

Baculovirus recombinants exprimant la protéine G_{α16} ou la protéine G_{α1f} sous contrôle du promoteur du gène P10.

Des cellules Sf9 de *Spodoptera frugiperda* cultivées comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus, sont co-transfectées avec l'ADN du baculovirus AcSLP10, et l'un des vecteurs p119-HA-G₁₆ ou p119-HA-G_{1f}.

Le baculovirus AcSLP10 (CHAABIHI et tal., J. Virol., 67, 2664-2671, 1993) est un baculovirus modifié qui possède un seul promoteur tardif fort (P10), qui contrôle l'expression de la séquence codant la polyédrine.

La co-transfection est effectuée par lipofection, comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus. Les baculovirus recombinants obtenus, dénommés AcSLP10G₁₆ et AcSLP10G_{1f} expriment respectivement p119-HA-G₁₆ ou p119-HA-G_{1f}, sous contrôle du promoteur p10. Ces baculovirus sont multipliés comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Baculovirus double-recombinants.

Les cellules Sf9 de *Spodoptera frugiperda* sont co-transfectées avec l'ADN du baculovirus AcSLP10, et l'un des vecteurs p119-HA-G₁₆ ou p119-HA-G_{1f}, et le vecteur de transfert pGmAcI50 (DEVAUCHELLE et CERUTTI, Les Baculovirus d'Insectes : Vecteurs d'expression de gènes étrangers, Regard sur la Biochimie, n°5, C2, 1991) qui contient la séquence codant pour la polyédrine sous contrôle de son propre promoteur. Les baculovirus recombinants exprimant les protéines G et la polyédrine, sont sélectionnés sur la base de leur phénotype ob+ (présence de corps d'inclusion), et multipliés. Les baculovirus recombinants obtenus, exprimant

respectivement p119-HA-G₁₆ ou p119-HA-G_{olf}, sous contrôle du promoteur p10, sont dénommés AcSLP10G₁₆Ph et AcSLP10G_{olf}Ph.

L'ADN de chacun des baculovirus AcSLP10G₁₆Ph ou AcSLP10G_{olf}Ph est utilisé pour co-transfecter des cellules Sf9 avec l'ADN du baculovirus pGmAc 217-209 ou du baculovirus pGmAc 217-210. Les baculovirus double-recombinants obtenus sont sélectionnés sur la base d'un phénotype viral ob-. Ces baculovirus double-recombinants sont dénommés comme AcG₁₆-209 ; AcG_{olf}-210 ; AcG₁₆-209 ; AcG_{olf}-210.

La Figure 1 B représente un schéma général des différentes étapes de construction d'un baculovirus double recombinant comprenant une séquence codant pour une protéine G associée à la séquence de marquage de l'épitope HA sous contrôle du promoteur P10, et une séquence codant pour un récepteur OR, associé au peptide signal du gène EGT et à la séquence de marquage de l'épitope FLAG, sous contrôle du promoteur modifié du gène polyédrine. Les baculovirus AcG₁₆-209 , AcG_{olf}-210, AcG₁₆-209 et AcG_{olf}-210 sont représentés sur la Figure 1 C.

EXEMPLE 3 : EXPRESSION DE RECEPTEURS OLFACTIFS ET DE PROTEINES G DANS LES CELLULES D'INSECTE.

Les cellules Sf9 sont récoltées 36-48 heures après infection. La production des récepteurs olfactifs ou de protéines G recombinantes est évaluée par transfert immunoélectrophorétique, en utilisant les anticorps dirigés contre leur étiquette épitopique FLAG ou HA.

Les cellules infectées par les baculovirus AcMNPV209 et AcMNPV210 expriment des protéines reconnues par l'anticorps anti-FLAG, et de poids moléculaire correspondant à celui des ORs.

Les cellules infectées par les baculovirus AcSLP10G₁₆ et AcSLP10G_{olf} expriment des protéines reconnues par l'anticorps anti-HA, et de poids moléculaire correspondant à celui des protéines G.

Les cellules infectées par les baculovirus double-recombinants AcG₁₆-209 , AcG_{01f}-210, AcG₁₆-209 et AcG_{01f}-210 expriment les 2 types de protéines.

La localisation cellulaire des ORs et des protéines G a été étudiée par immunofluorescence 36 heures après l'infection. Les ORs sont détectés par un anticorps primaire anti-FLAG et un anticorps secondaire marqué au FITC. Les protéines G sont détectées par un anticorps anti-HA marqué à la rhodamine.

Les cellules marquées sont observées en microscopie confocale. Dans les cellules infectées par les baculovirus AcMNPV209 et AcMNPV210, on observe une localisation du marquage à la surface cellulaire, et une répartition ponctuelle typique des récepteurs membranaires. Dans les cellules infectées par les baculovirus AcSLP10G₁₆ et AcSLP10G_{01f} on observe une localisation cytoplasmique sous-membranaire du marquage. Dans les cellules infectées par les baculovirus double-recombinants AcG₁₆-209 , AcG_{01f}-210, AcG₁₆-209 et AcG_{01f}-210, on observe une co-localisation du récepteur avec chaque protéine G co-exprimée. Aucune différence majeure entre OR17-209 et OR17-210 n'est observée en ce qui concerne une liaison préférentielle avec G_{01f} ou G₁₆. Il apparaît donc que ces deux récepteurs sont capables de se coupler aux deux protéines G dans les cellules d'insecte.

EXEMPLE 3 : FONCTIONNALITE DES RECEPTEURS EXPRIMES DANS LES CELLULES D'INSECTE.

Dans une première série d'expérimentations, la possibilité de mesurer la réponse calcium dans les cellules Sf9 en utilisant la technique de l'imagerie calcique a été testée.

Le protocole utilisé pour les essais est le suivant :

Les cellules Sf9 sont cultivées sur des plaques de 24 puits contenant des lamelles couvre-objet de 12 mm. Avant les expérimentations, le milieu de culture est éliminé et lavé par un tampon contenant 10 mM de NaCl, 60 mM de KCl, 25 mM de MgCl₂, 1,8 mM de CaCl₂, 4 mM de D-glucose, 110 mM de

sucrose et 10 mM d'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique ; le pH est ajusté à 6,2 à température ambiante avec la base TRIZMA.

Les cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante dans le noir avec une solution de MBS contenant du fura 2-AM (4 μ M) (sonde moléculaire). Les cellules sont ensuite lavées avec un excès de MBS sans fura 2-AM et montées dans une chambre COVERWELL (POLYLABO, France) (diamètre : 9 mm ; épaisseur : 2,5 mm ; section : 22,5).

La chambre est placée sous le microscope, et les cellules sont perfusées sous gravité avec 0,85 ml/mn (3,78 cm/mn) à température ambiante (23°C).

Les mesures de fluorescence fura-2 sont réalisées en utilisant un système d'illumination de longueur d'onde multi-voies POLYCHROME II T.I.L.L PHOTONICS GmbH, (PLANEgg) pour l'extinction. Le microscope (OLYMPUS) est équipé avec un objectif de distance longue portée (X20). Les distributions spatio-temporelles de Ca^{2+} sont étudiées en utilisant une caméra interligne PCO. La longueur d'onde d'excitation du colorant varie alternativement entre 340 et 380 nm et est adaptée au temps d'exposition de la caméra (20-40 msec ; binning : 2). L'acquisition et le calcul des images de fluorescence sont réalisés en utilisant le logiciel T.I.L.L-VISION. Tous les signaux sont rapportés au bruit de fond. Les rapports de fluorescence (f_{340}/f_{380}) sont calculés pour les variations de Ca^{2+} intracellulaires.

L'effet des produits suivants sur la variation du Ca^{2+} intracellulaire a été testé :

- l'ionophore 4-bromo-A23187, utilisé à une concentration de 5 μ M ;

- l'octopamine, utilisée à une concentration de 50 μ M, comme contrôle de la capacité des cellules Sf9 à augmenter la concentration en calcium intracellulaire en réponse à l'activation du récepteur à l'octopamine qui est un récepteur couplé aux protéines G/IP3 naturellement présent dans les cellules Sf9 ;

- le mélange HENKEL 100 (HENKEL), qui est un mélange de 100 composés d'arôme différents à la même

concentration (1% p/p). Cette solution est diluée au 1/10000 dans le milieu de culture avant utilisation.

Tous les produits sont ajoutés dans la perfusion au moyen d'un distributeur manuel.

5 Les résultats obtenus sur les cellules Sf9 non-infectées sont illustrés par la Figure 2. Les signaux Ca^{2+} résultent de la moyenne effectuée sur toutes les cellules dans le champ de la caméra (signal gris) et de la moyenne pour les cellules répondantes (signal noir) ($n=4$). On observe
10 que l'ionophore 4-bromo A23187 induit une forte augmentation du calcium intracellulaire (graphique du haut). En revanche le mélange odorant HENKEL 100 (graphique du bas, A) ne produit pas de changement du calcium intracellulaire, alors que l'octopamine (graphique du bas, B) induit une
15 augmentation du calcium intracellulaire. Ces résultats montrent que les cellules Sf9 ne possèdent pas de récepteurs olfactifs endogènes dont l'activité pourrait interférer avec celle de récepteurs recombinants exprimés dans ces cellules.

Dans une seconde série d'expérimentation, la
20 capacité des récepteurs OR17-209 et OR17-210 humains, seuls ou co-exprimés avec les protéines G, à répondre aux molécules odorantes a été testée.

Les cellules Sf9 sont infectées avec les baculovirus AcMNPV, AcMNPV209, AcMNPV210, AcG₁₆-209, AcG₁₆-210, AcG_{olf}-209, ou AcG_{olf}-210, et 36 heures après l'infection les réponses cellulaires au mélange HENKEL 100 (10 μM) ou à l'octopamine (50 μM) sont enregistrées par imagerie calcique, comme décrit ci-dessus pour les cellules non-infectées.
25

Les résultats sont illustrés par la Figure 3. Les
30 signaux Ca^{2+} résultent de la moyenne à partir des cellules répondantes à l'intérieur du champ de la caméra [récepteur OR17-209 ($n=12$)/OR17-210 ($n=6$)/OR17-210-G₁₆ ($n=10$)/OR 17-209-G₁₆ ($n=15$)/OR17-209-G_{olf} ($n=6$)/OR17-210-G_{olf} ($n=4$)].

A : stimulation par le mélange HENKEL 100 ;
35 B : stimulation par l'octopamine.

Ces résultats montrent que le mélange odorant HENKEL 100 induit un signal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transitoire pour les deux récepteurs OR17-209 et OR17-210 exprimés seuls ou co-exprimés

avec la protéine G_{16} . En revanche, on n'observe aucune augmentation du calcium intracellulaire dans le cas des récepteurs exprimés avec la protéine G_{olf} . Dans toutes ces cellules l'octopamine induit une augmentation du calcium intracellulaire.

Alors que la co-expression des ORs dans les cellules Sf9 avec la protéine G_{16} conserve la réponse calcium, leur co-expression avec les protéines G_{olf} entraîne une disparition de cette réponse. Ceci démontre que dans les cellules d'insecte, la réponse aux molécules odorantes est basée sur la libération de Ca^{2+} due au couplage des récepteurs olfactifs aux protéines G endogènes.

Les résultats ci-dessus montrent clairement que les récepteurs olfactifs OR17-209 et OR17-210 humains peuvent être fonctionnellement exprimés dans des cellules Sf9, seuls ou avec la protéine G_{16} .

Quand les récepteurs olfactifs sont exprimés avec la protéine G_{olf} aucun changement de $[Ca^{2+}]_i$ n'est observé à la suite de l'application de molécules odorantes. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'expression de G_{olf} dans les cellules Sf9 détourne la cascade de signalisation vers une voie qui devient indétectable par l'imagerie calcique. Dans les neurones olfactifs, il est connu que la liaison des molécules odorantes aux récepteurs olfactifs provoque via la protéine G_{olf} , la production d'AMPC qui ouvre directement des canaux calciques contrôlés par les nucléotides cycliques (CNG) dans la membrane plasmique. Ce type de canal est probablement absent des cellules d'insecte Sf9, ce qui mène à l'impossibilité de détecter une réponse calcium quand les récepteurs olfactifs sont co-exprimés avec la protéine G_{olf} dans ces cellules Sf9. Ces résultats montrent également que les récepteurs olfactifs co-exprimés avec la protéine G_{olf} se couplent de préférence à celle-ci plutôt qu'aux protéines G endogènes.

REVENDICATIONS

- 1) Cassette d'expression comprenant :
 - a) un promoteur dérivé du promoteur de la polyédrine d'un baculovirus par délétion de tout ou partie de la région dudit promoteur s'étendant des positions -1 à -12 par rapport au site d'initiation de la traduction de la polyédrine ;
 - b) une séquence codant pour un récepteur à sept domaines transmembranaires, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.
- 2) Cassette d'expression selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, en amont de la séquence b) une séquence codant pour un peptide signal.
- 3) Cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit récepteur à sept domaines transmembranaires est un récepteur olfactif.
- 4) Procédé pour exprimer un récepteur à sept domaines transmembranaires dans une cellule d'insecte, caractérisé en ce que l'on infecte ladite cellule d'insecte avec un baculovirus recombinant comprenant une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on exprime également dans la même cellule d'insecte, une protéine G.
- 6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite protéine G est exprimée sous contrôle du promoteur du gène P10 d'un baculovirus.
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on utilise un baculovirus double-recombinant, comprenant :
 - une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 3 ; et
 - une séquence codant pour une protéine G placée sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène P10 dudit baculovirus.

8) Baculovirus recombinant comprenant une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 3.

5 9) Baculovirus recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite cassette d'expression est insérée en remplacement du promoteur et du gène de la polyédrine dudit baculovirus.

10 10) Baculovirus recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit baculovirus comprend en outre une séquence codant pour une protéine G placée sous contrôle transcriptionnel du promoteur du gène P10.

11) Cellule d'insecte infectée par un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 8 à 10.

15 12) Utilisation d'une cellule d'insecte selon la revendication 11, pour déterminer la fonctionnalité d'un récepteur à sept domaines transmembranaires putatif.

20 13) Utilisation d'une cellule d'insecte selon la revendication 11 pour identifier le(s) ligand(s) d'un récepteur à sept domaines transmembranaires orphelin.

14) Utilisation d'une cellule d'insecte selon la revendication 11 pour identifier un (des) récepteur(s) à sept domaines transmembranaires capables de se lier à un ligand d'intérêt.

25 15) Utilisation selon une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que ledit récepteur à sept domaines transmembranaires est un récepteur olfactif.

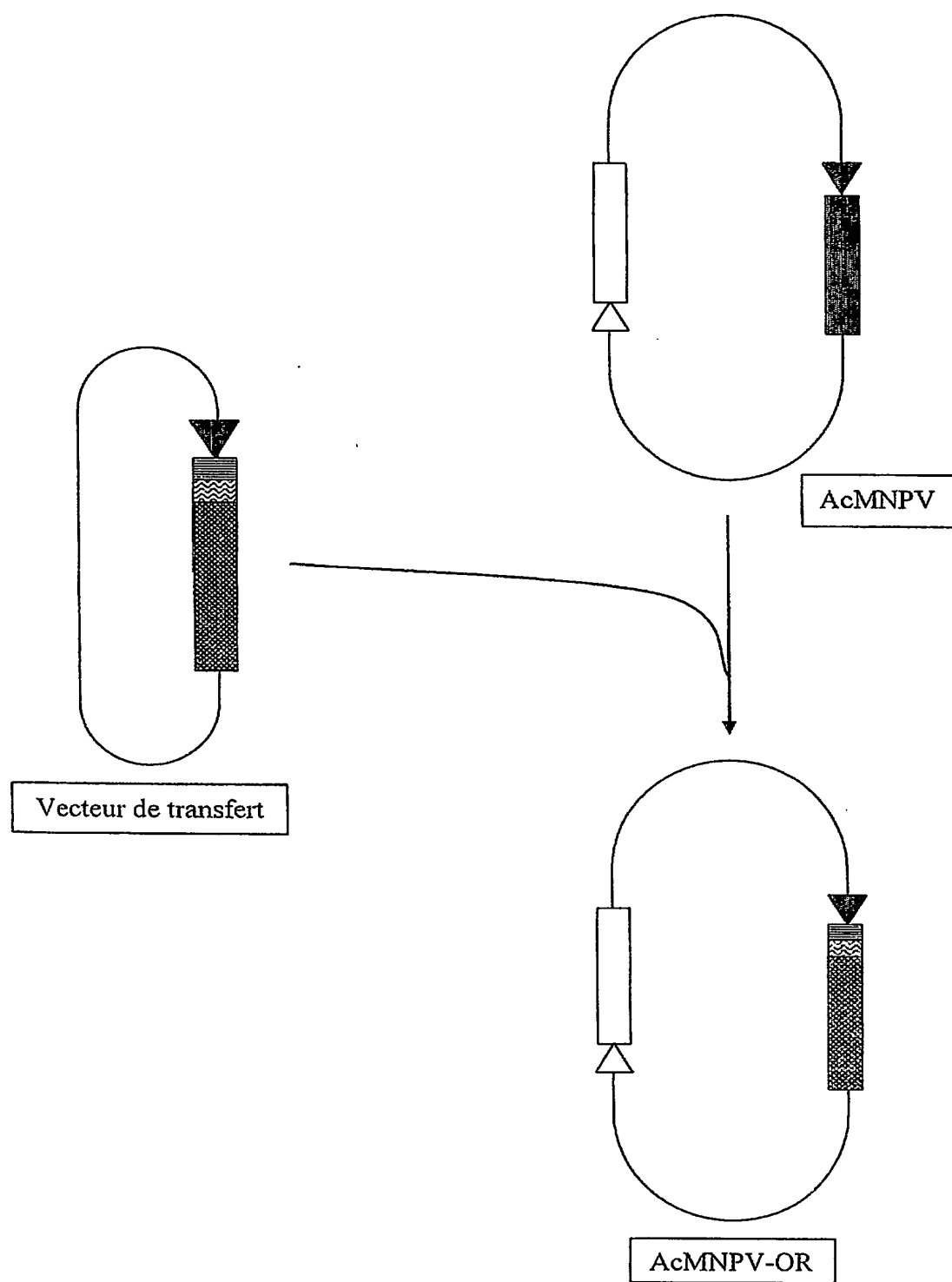


FIG. 1A

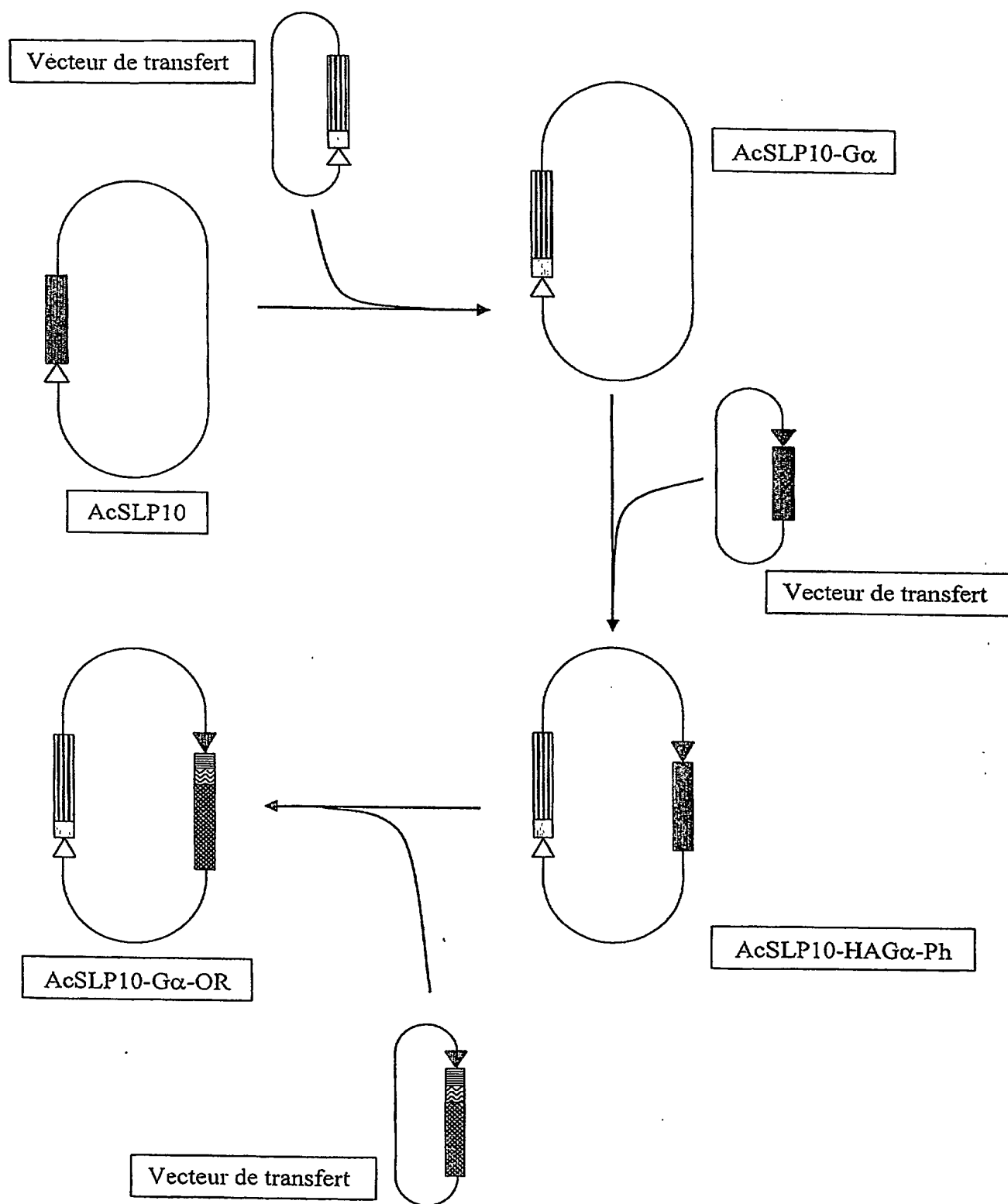
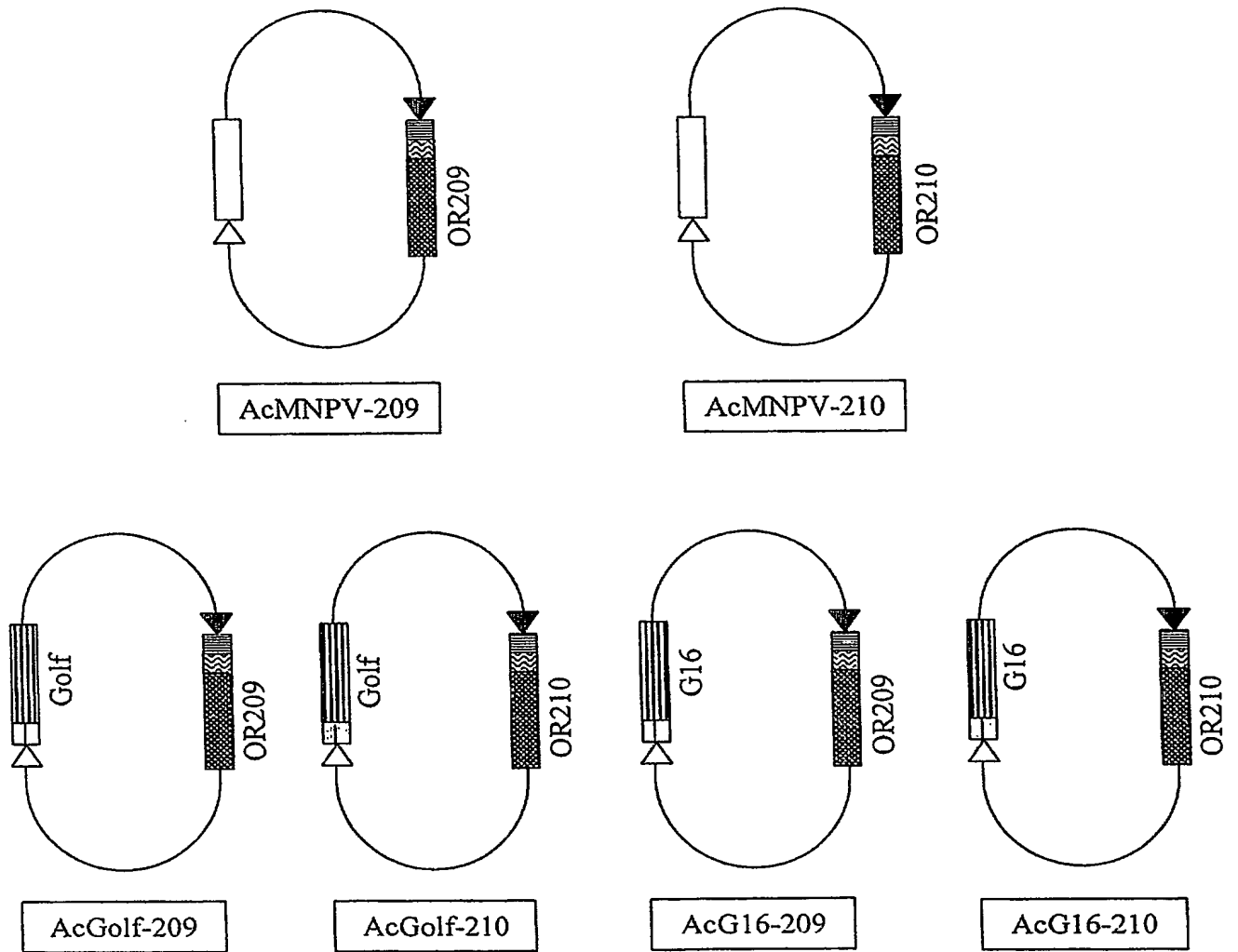


FIG. 1B

**FIG. 1C**

4/5

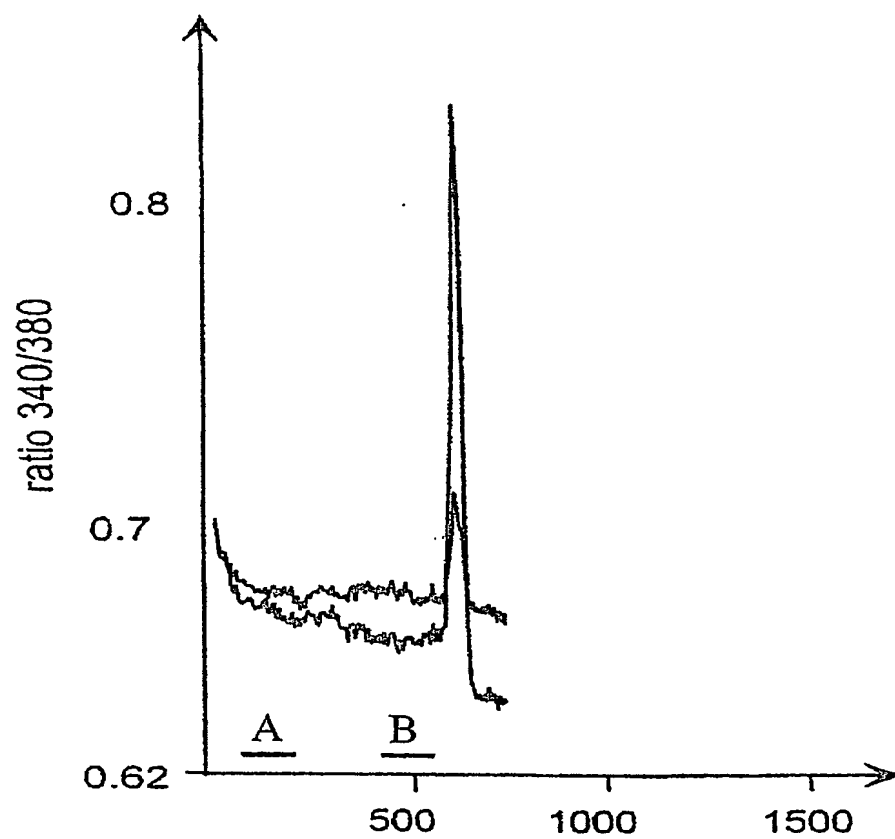
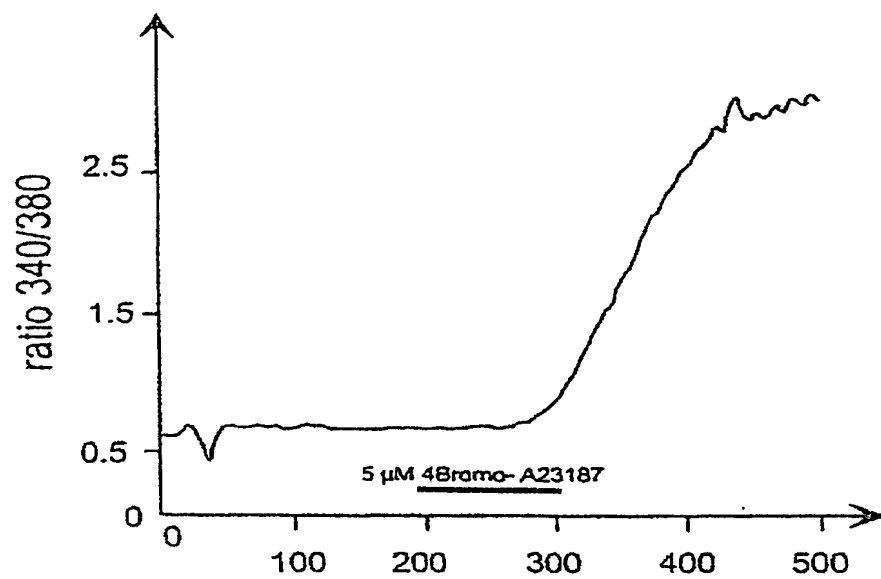


FIG. 2

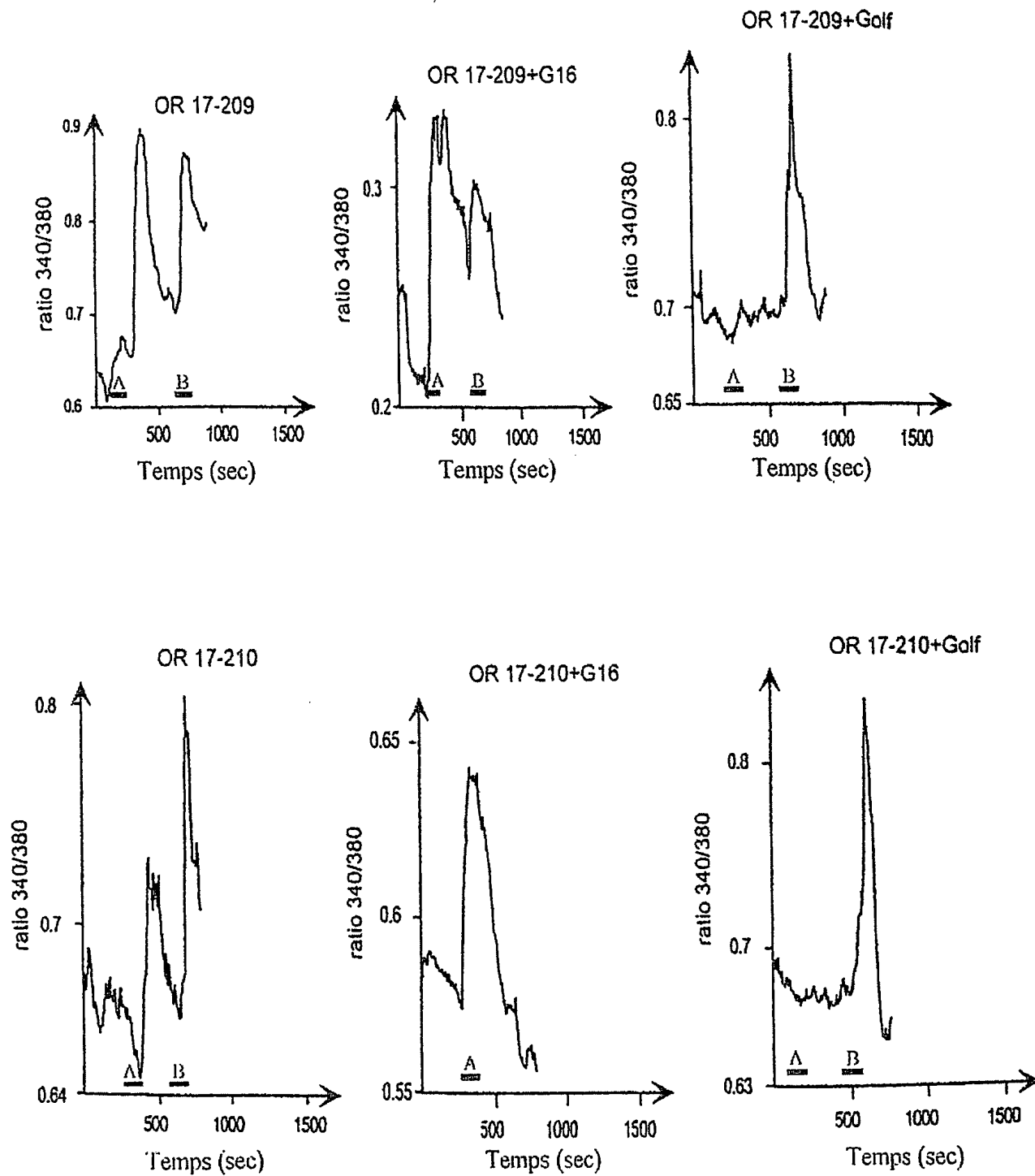


FIG. 3

644s68.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CNRS

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

INRA

<120> EXPRESSION DE RECEPTEURS A 7 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES EN SYSTEME
BACULOVIRUS/CELLULES D'INSECTES

<130> MJPbv644/68

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence codant pour la
fusion EGT-épitope FLAG

<400> 1
atgactattc tctgctggct tgcactgctg tctacgctta ctgctgttaa cgcggactac 60
aaggacgatg atgacaaagc catggctgct cggtaccctg cagagctc 109

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 2
taagaagctt gccacatgg aggggaaaaa tctg 34

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 3

taacggtacc gcggccgcct aaggggaatg aattttccg

39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 4

caataagctt ccatggctat gtatttgtgt ctcagcaac

39

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 5

taacggtacc gcggccgctt aagccactga tttagagtg

39

<210> 6

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

644s68.ST25

<400> 6
ttacgatatc agatctgcca ccatgtaccc ctacgacgtc cctgactacg ccatggcccg 60
ctcgctgacc 70

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 7
ctataagctt tcacagcagg ttgatctcgt ccag 34

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 8
ttacgatatc agatctgcca ccatgtaccc ctacgacgtc cctgactacg ccatgggggtg 60
tttgggcaac 70

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 9
ctataagctt tcacaagagt tcgtactgct tgag 34

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: motif conservé au début du domaine transmembranaire II des récepteurs olfactifs

<400> 10

Pro Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: motif conservé à la fin du domaine transmembranaire IV et au début de la boucle intracellulaire i2 des récepteurs olfactifs

<400> 11

Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys
1 5 10

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: motif conservé au début du domaine transmembranaire VI des récepteurs olfactifs

<400> 12

Phe Ser Cys Ser Ser His
1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

644s68.ST25

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: motif conservé dans le domaine transmembranaire VII des récepteurs olfactifs

<400> 13

Pro Met Leu Asn Pro Phe
1 5

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/68FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 09377
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Expression de récepteurs à 7 domaines transmembranaires en système baculovirus/cellules d'insectes.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
1 - CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel-Ange, F-75016 PARIS		
2 - INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - F-75007 PARIS		
3 - UNIVERSITE MONTPELLIER 2 - Place Eugène Bataillon - F-34095 MONTPELLIER CEDEX 05		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		DEVAUCHELLE
Prénoms		Gérard
Adresse	Rue	137 Chemin de l'Espervette
	Code postal et ville	3 1 0 1 3 1 8 1 0 SAINT-CRISTOL-LES-ALES
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		DEMAILLE
Prénoms		Jacques, Gaston, Jean
Adresse	Rue	8, Chemin de Versailles
	Code postal et ville	3 1 4 1 9 1 8 1 0 MONTFERRIER-SUR-LE-LEZ
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		FERRAZ
Prénoms		Conception
Adresse	Rue	Le Clos des Elbes 141, rue des Eucalyptus
	Code postal et ville	3 1 4 1 0 1 9 1 0 MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 27 février 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/68FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 09377
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Expression de récepteurs à 7 domaines transmembranaires en système baculovirus/cellules d'insectes.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
1 - CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel-Ange, F-75016 PARIS		
2 - INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - 147, rue de l'Université - F-75007 PARIS		
3 - UNIVERSITE MONTPELLIER 2 - Place Eugène Bataillon - F-34095 MONTPELLIER CEDEX 05		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	MATARAZZO
	Prénoms	Valéry
Adresse	Rue	375, rue Georges Lamarque
	Code postal et ville	7 1 3 0 0 0 BASSENS
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	RONIN
	Prénoms	Catherine
Adresse	Rue	23, rue Lamartine
	Code postal et ville	1 1 3 1 9 1 6 0 SAUSSET-LES-PINS
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	CERUTTI
	Prénoms	Martine
Adresse	Rue	2997, Route de Montèze
	Code postal et ville	3 1 0 3 8 0 SAINT-CRISTOL-LEZ-ALES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 27 février 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.